

## 羅布麻の機能性食品としての有効性とその開発研究

著者	香川 珠実
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成25年度
学位授与番号	30110乙第104号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00006640/">http://id.nii.ac.jp/1145/00006640/</a>

# 論文要旨

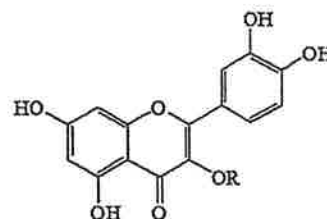
## 羅布麻の機能性食品としての有効性とその開発研究

平成 25 年度

香川 珠実

羅布麻(Luobuma: *Apocynum venetum* L.)の葉は、中国では古くから薬やお茶として使用され、中国伝統薬として知られている。羅布麻葉の効能として、降圧作用の報告があるがその詳細なメカニズムは不明である。本研究では、高血圧の予防に役立つ機能性食品としての羅布麻葉の有効性を探るため、羅布麻茶葉エキス(Luobuma leaf extract : LLE)の降圧作用とメカニズム、さらに反復投与毒性とヒトでの有効性について検討し、新しい知見を得た。

1. 羅布麻葉と、中国で羅布麻として流通している *P. hendersonii* の葉について、RP-18 に水/酢酸/メタノール混液 (6 : 2 : 1) を展開溶媒とした薄層クロマトグラム法を用い、簡便に基原の確認ができることを示した。さらに、Navi C18-5 カラムにメタノール/水/酢酸 (100 : 300 : 20) を移動層として用いた液体クロマトグラム法にて、*A. venetum* を基原とする製品やその原料のどの段階においても同一条件で、LLEの主フラボノイド成分である hyperoside (HP) と isoquercitrin (IQ) (Fig.1) の定量が可能であった。よって、羅布麻製品の品質を管理する上で簡便な方法の確立ができた。



hyperoside : R = galactosyl  
isoquercitrin : R = glucosyl

Fig.1. The structures of flavonoids

2. LLE の降圧作用とその機序の検討を行った。LLE を無麻酔下にて高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats : SHR) 及び Wistar 系ラット (Wistar Kyoto rat : WKY) に経口投与した結果、SHR では用量依存性の降圧作用が認められたが、WKY では認められなかった。次に、麻酔下 SHR または Sprague Dawley 系ラットへ LLE を十二指腸内投与した結果、LLE は *d*-noradrenaline あるいは acetylcholine の血圧反応に影響しなかったことから、LLE の降圧作用は交感神経系の抑制に基づくものではないと考えられた。また angiotensin I から angiotensin II に代謝された後昇圧する作用に対して LLE は影響しなかったことから、LLE の降圧作用は ACE 阻害作用に基づくものではないと考えられた。

さらに、抵抗血管であるラット摘出腸間膜動脈血管床を用い、LLEの血管拡張作用とその発現機序について検討した。ラット腸間膜動脈灌流標本(内皮保持標本)において、LLE (100 pg/ml - 100 mg/ml) の15分灌流により、濃度依存的な血管弛緩反応が観察されたが、内皮除去標本では抑制され、このLLEの血管弛緩作用は内皮依存性であることが明らかになった。また、LLEによる血管弛緩反応に対する各種内皮由来弛緩因子阻害薬の影響を調べた結果から、LLEの内皮依存性の血管弛緩は、低濃度ではK<sup>+</sup>チャンネルを介した内皮由来過分極因子 (Endothelium-deprived hyperpolarizing factor: EDHF)、高濃度ではEDHF及び一酸化窒素 (nitric oxide : NO) による血管弛緩作用を示すことを明らかにした。これまでに、Kwanらは羅布麻葉エキスをラット摘出冠動脈に用い、NOによる内皮依存性の血管弛緩作用を有することを報告している。従って、LLEの内皮由来弛緩作用は、冠動脈血管では主にNO、抵

抗血管である腸間膜血管では主にNOとEDHFによることが示唆された。

3. LLEの主フラボノイド成分であるHPとIPの降圧作用とその機序について検討した。無麻酔下SHRへHP, IQ, 両成分等量混合物(「HP+IQ」)をそれぞれ20, 40 mg/kg 経口投与した結果, 「HP+IQ」40 mg/kg 投与群において投与7週間目で有意な降圧作用が認められた。その他の投与群では有意な降圧作用は認められなかった。投与7週間後, 「HP+IQ」が血管機能へ及ぼす影響について, 冠動脈中膜(平滑筋)の厚さ及び内皮由来弛緩因子であるNOの放出量を調べた。免疫化学組織染色による形態計測の結果, 血管中膜の肥厚抑制傾向が認められた。また, 免疫化学組織染色により冠動脈の血管内皮NO合成酵素活性の上昇が観察され, 血中NO量において有意な上昇が認められた。In vivo試験で, 「HP+IQ」は血管中膜の肥厚を抑制するとともに, 血管内皮機能を改善し, NOを介した血管平滑筋弛緩による降圧作用を有することが明らかとなった。

上記の結果から, HP及びIQはそれぞれ単独では降圧作用を示さないが, 両成分の共存下で有意な降圧作用を示した。HP, IQはそれぞれアグリコンのquercetinにgalactose, またはglucoseが結合したケルセチン配糖体で, 両成分はよく似た構造の化合物であるが, 糖残基が腸管での吸収に影響することが推測された。そこでHPとIQの腸管吸収について明らかにするため, HP 20 mg/kg, IQ 20mg/kg, 「HP+IQ」40 mg/kgをSHRへ経口投与し, 投与後24時間における血中代謝物濃度(quercetin + isorhamnetin)をLC/MS/MSにより測定した。

血中ケルセチン代謝物の最高血中濃度到達時間(T<sub>max</sub>)は, HP投与では約6時間, IQ投与では約1-3時間であり, HPは主に大腸, IQは主に小腸で吸収されることが示された。各群における全血中ケルセチン代謝物濃度推移において, HP投与群とIQ投与群を比較すると, 投与後ほぼ24時間を通してHPよりもIQの方が有意に高い濃度推移を示した。「HP+IQ」投与群の全血中代謝物濃度は, 投与後0.5-1時間ではIQよりも有意に低い推移を示し, 投与6時間後からはHP及びIQ単独の代謝物濃度をほぼ合わせた推移を示した。

本研究においてHPが主に大腸で吸収されることをはじめて明らかにした。「HP+IQ」同時投与した場合には, HP, IQ単独投与の場合より血中におけるケルセチン代謝物濃度は上下変動が少なく, 一定濃度が持続して推移する傾向が認められた。この血中代謝物濃度推移の相違が, 両成分が単独では降圧作用を示さないが, 共存下において降圧作用を示すことに関与していると考えられた。

4. LLEの毒性を評価するため, 雌雄のWistarラットを用いて90日間反復投与試験を行った。LLEを90日間, 1,000 mg/kg/日及び2,000 mg/kg/日の用量にてラットに投与した結果, 外観や行動に異常は認められなかった。また血液検査値, 生化学検査値及び尿検査値に毒性による顕著な影響は認められなかった。投与終了後の臓器重量測定, 肉眼検査, 病理組織検査においても異常は認められなかった。LLEの経口投与による無影響量は雌雄ラット共に, 2,000 mg/kg/日であり, LLEの安全性が高いことを明らかにした。

5. LLEのヒトでの有効性について検討するため, LLE 2,200 mgより製した「LLE含有飲料」(「HP+IQ」30mg含有, 1本500 ml)を正常高値血圧者及び軽症高血圧者へ12週間摂取させる2重盲検並行2群間試験を実施した。その結果, プラセボ食摂取群は, 摂取期間中血圧値の有意な変動は認められなかったのに対し, LLE含有飲料摂取群では, 収縮期血圧及び拡張期血圧が摂取開始8週間以降有意に降下した。また, LLE含有飲料摂取群では, 収縮期血圧及び拡張期血圧が摂取8, 10, 12週間後に, プラセボ食摂取群に比して有意な低値を示した。以上の結果から, 正常高値血圧者及び軽症高血圧者に対し, LLE含有飲料は1日1回の摂取, 且つその有効成分であるフラボノイド成分「HP+IQ」は30mgという少ない用量で降圧効果を示すことから, 高血圧の予防のための機能性食品として有用性は非常に高いという知見を得た。